

JACEK POSTUPOLSKI, BEATA JANKOWSKA¹⁾, BOGUMIŁA URBANEK-KARŁOWSKA

OCENA METODY OZNACZANIA AFLATOKSYN W ORZECHACH
ARACHIDOWYCH PRZY UŻYCIU CHROMATOGRAFII
POWINOWACTWA IMMUNOLOGICZNEGO Z DETEKcją
FLUORYMETRYCZNĄ

EVALUATION OF THE IMMUNOAFFINITY CHROMATOGRAPHY COUPLED
WITH FLUORIMETRY DETECTION METHOD FOR DETERMINATION OF
AFLATOXINS IN PEANUTS

Zakład Badania Żywności i Przedmiotów Użytku, Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: doc. dr hab. *K. Karłowski*

¹⁾ Katedra i Zakład Bromatologii, Akademia Medyczna w Warszawie
02-097 Warszawa, ul. Banacha 1
Kierownik: prof. dr hab. *R. Olędzka*

W pracy przedstawiono ocenę metody chromatografii powinowactwa immunologicznego do oznaczania sumy aflatoksyn w orzechach arachidowych z wykorzystaniem testu AFLATEST firmy Vicam. Wyznaczono parametry analityczne metody: odzysk, precyzję i dokładność. Metoda ta może być stosowana do półilościowego oznaczania aflatoksyn w rutynowej kontroli żywności.

Czynniki środowiskowe obejmujące m.in. wiele związków chemicznych są jedną z głównych przyczyn chorób nowotworowych. Zalicza się do nich m.in. aflatoksyny – grupę związków uznawanych za rakotwórcze dla ludzi [6]. Obecnie w ponad 60 państwach istnieją lub są opracowywane narodowe programy kontroli dotyczące mikotoksyn, obejmujące monitoring oraz zbieranie informacji o skutkach zdrowotnych powodowanych przez nie. Ustanowiono dla nich maksymalne dopuszczalne poziomy jako zanieczyszczeń w żywności i paszach [3,4]. Ze względu na konieczność kontroli poziomów aflatoksyn w żywności, podejmowane są prace mające na celu opracowanie nowych metod, o lepszej wykrywalności i precyzji. Równocześnie oczekuje się, że metody będą prostsze w wykonaniu, szybsze i tańsze.

Coraz szersze zastosowanie znajdują szybkie testy służące do wykrywania lub półilościowego oznaczania mikotoksyn (aflatoksyny, ochratoksyna, zearalenon, fumonizyny). Testy te wykorzystują metody immunoenzymatyczne (ELISA) lub radioimmunologiczne (RIA). Metody znajdują mniejsze zastosowanie ze względu na gorszą wykrywalność i konieczność bezpiecznego usuwania związków znakowanych. Osobną grupę stanowią testy z zastosowaniem chromatografii powinowactwa z użyciem przeciwciał monoklonalnych i detekcją fluorymetryczną. Ich zaletą jest krótszy, w porównaniu z innymi metodami, czas wykonywania analizy oraz znaczna prostota. Do wad należy

zaliczyć brak możliwości rozdzielenia poszczególnych mikotoksyn (np. w przypadku aflatoksyn), możliwość występowania reakcji krzyżowych, niejednokrotnie mniejszą wykrywalność w porównaniu z metodami fizykochemicznymi jak również, w przypadku testów ELISA, nieopłacalność przy stosowaniu małej liczby oznaczeń. Konieczne jest również, jak w każdej metodzie oznaczania mikotoksyn, potwierdzanie wyników pozytywnych lub wątpliwych [2,10].

Test AFLATEST, produkcji firmy Vicam, USA, jest szybkim testem służącym do półilościowego oznaczania sumy aflatoksyn B₁, B₂, G₁, G₂ i M₁ w surowcach, środkach spożywczych i paszach metodą chromatografii powinowactwa immunologicznego z detekcją fluorymetryczną. Test ten został sprawdzony w badaniach międzylaboratoryjnych i uzyskał pozytywną ocenę Association of Official Analytical Chemists (AOAC) dla kukurydzy, orzechów arachidowych i masła orzechowego w zakresie stężeń 10–30 µg/kg [11].

Celem pracy była ocena przydatności ww. testu do rutynowej kontroli zanieczyszczeń aflatoksynami przy wymaganym poziomie 5 µg/kg wyrażonym jako suma aflatoksyn.

MATERIAŁY I METODYKA

Wypożyczenie

Do badań zastosowano wyposażenie zalecane przez firmę Vicam: fluorymetr Torbex FX-100, USA, wzbudzenie 365–380 nm, emisja 450–550 nm, z drukarką DPU-411 Thermal Printer, Seiko, Japonia; homogenizator laboratoryjny Waring, USA; młynek laboratoryjny typ 11.1, Glem Mills, USA; pompka powietrzna nr kat. 21020 VICAM, USA.

Odczynniki i materiały pomocnicze

1. Kolumny powinowactwa immunologicznego, Aflatest-P, VICAM, USA, o pojemności 50 ng AFB₁, otrzymane wg. *Groopmana* i *Donahue'a* [5]. 2. wzorzec aflatoksyny B₁ (AFB₁) w chloroformie – roztwór standaryzowany 10 µg/cm³, National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, Holandia. Wzorce robocze przygotowano wg. PN-R-64757:1994 [9]. 3. wzorce do kalibracji fluorymetru (Aflatest-P Calibration Standards), VICAM, USA:

wzorzec „czerwony” – roztwór chininy w 0,1 N H₂SO₄, odpowiadającym fluorescencji roztworu AFB₁₀ stężeniu 24 µg/kg,

wzorzec „zielony” – próba ślepa, 0,1 N H₂SO₄

wzorzec „żółty” – roztwór chininy w 0,1 N H₂SO₄, odpowiadającym fluorescencji roztworu AFB₁₀ stężeniu 12 µg/kg,

4. roztwór bromu – wywoływacz (Aflatest Developer), VICAM, USA. Roztwór roboczy 0,02% uzyskano przez 10-krotne rozcieńczenie roztworu podstawowego. Roztwór roboczy przygotowywano każdorazowo w dniu oznaczania, trwałość 8 h. 5. metanol HPLC, Ridel-de Haen, Niemcy, 6. metanol cz.d.a. Merck, Niemcy, 7. chlorek sodu cz.d.a. POCh Gliwice, 8. sączki karbowane, nr kat. 31240 VICAM, USA¹, 9. sączki z włókna szklanego, nr kat. 31955 VICAM, USA², 10. certyfikowany materiał odniesienia CRM 385; Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ and total aflatoxin in peanut butter (high level), Community Bureau of Reference, Belgia.

¹ Odpowiednikiem może być np. Whatman No.2

² Odpowiednikiem może być np. Whatman 934 – AH

³ Autorzy dziękują pani mgr inż. B. Michalskiej z PSSE w Gdyni za przekazanie próbek do badań

Do badań precyzji i odzysku użyto orzechów arachidowych łuskanych palonych, importowanych z Chin. Zbadano również próbki orzechów arachidowych pobranych w ramach nadzoru sanitarnego przez Portową Stację Sanitarno-Epidemiologiczną w Gdyni³.

Do oznaczeń stosowano wyłącznie wodę destylowaną.

Metody badań

Aflatoksyne oznaczano w próbkach orzechów niefortyfikowanych, fortyfikowanych i materiale odniesienia zgodnie z procedurą proponowaną przez producenta dla orzechów arachidowych, orzechów i produktów z nich otrzymanych [1].

Próbkę 25 g rozdrobnionych orzechów arachidowych umieszczono w homogenizatorze, dodawano 5 g NaCl i 125 cm³ 60% metanolu i następnie homogenizowano przez 1 min przy wysokich obrotach. Zawiesinę sączono przez bibułę filtracyjną. Do 10 cm³ przesączu dodawano 10 cm³ wody, dokładnie mieszano i filtrowano przez sączek z włókna szklanego. 10 cm³ tak przygotowanego ekstraktu przepuszczano przez kolumnę Aflatest-P przy użyciu pompki powietrznej, utrzymując wypływ cieczy z kolumny z szybkością 1–2 krople na sekundę. Kolumnę przemywano dwukrotnie 10 cm³ wody, a następnie przepuszczano kilka cm³ powietrza. Następnie powoli przepuszczano kolumnę 1 cm³ metanolu HPLC. Eluat zbierano do kувety, dodawano 1 cm³ 0,02% roztworu roboczego bromu (wywoływacz), energicznie mieszano, umieszczano w wykalibrowanym fluorymetrze i po 60 s mierzono fluorescencję. Wynik odczytywano w µg/kg.

Próbki orzechów fortyfikowano metanolem roztworem wzorcowym aflatoksyny B₁ (AFB₁) w ilościach odpowiadających końcowemu stężeniu 1, 2, 4, 6, 10 µg/kg. Dla każdego stężenia wykonywano po 5 równoległych oznaczeń. Równocześnie oznaczono zawartość aflatoksyny „naturalnie” występującej w orzechach. Wyniki poddano analizie statystycznej.

Wydajności i pojemności kolumny sprawdzono wg. projektu normy ISO [8]. Na kolumnę nanoszono 10 cm³ 30% roztworu metanolu, zawierającego 10 (wydajność) i 50 (pojemność) ng AFB₁ i postępowano dalej zgodnie z podaną wyżej procedurą.

W celu sprawdzenia kalibracji fluorymetru do kувety fluorymetru dodano metanolem roztwór wzorca z ilości zawierającej 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20 ng AFB₁, metanol do objętości 1 cm³, 1 cm³ roztworu 0,02% bromu, dokładnie wymieszano a następnie, po 60 s dokonywano odczytu fluorescencji.

W czasie pracy z aflatoksynami zachowano środki ostrożności i sposób postępowania z odpadami zalecane przez IARC [7].

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Sprawdzona wydajność kolumny Aflatest-P wynosi 96,5%, a pojemność 47,5 ng AFB₁ (w obu przypadkach średnia z dwóch próbek). Zarówno wydajność jak i pojemność jest zadowalająca i zgodna z deklaracjami producenta.

Uzyskane wyniki sprawdzenia kalibracji fluorymetru przedstawia tabela I.

Zwraca uwagę, że dla ilości 0,5 i 1 ng AFB₁ wartość odczytana jest zbyt niska (0 i 19%) w stosunku do ilości dodanej, co przedstawia rycina 1. Ilość aflatoksyn, zawarta w eluacie, musi być większa niż 2 ng, co jest, jak się wydaje, czynnikiem ograniczającym oznaczalność metody (rycina 1).

Uzyskane rezultaty badania odzysku i precyzji oraz dokładność testu (sprawdzone przez oznaczenie zawartości aflatoksyn w certyfikowanym materiale odniesienia o deklarowanej zawartości sumy aflatoksyn) przedstawia tabela II.

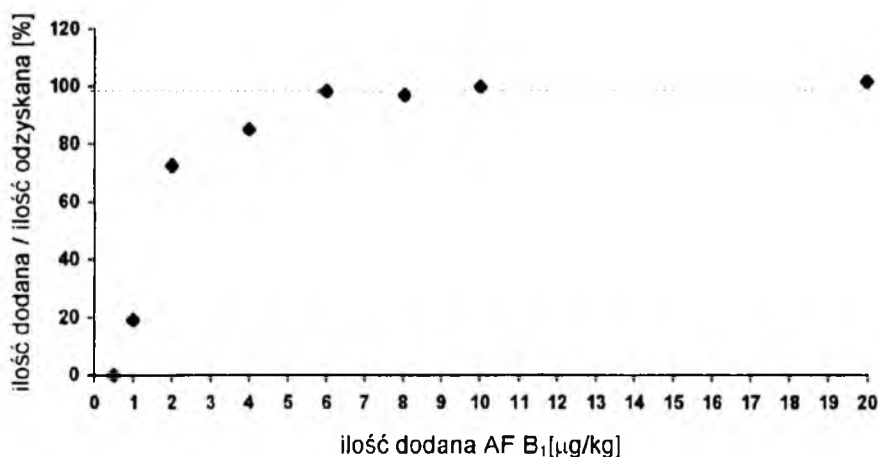
Wiarygodność metody oceniono fortyfikując serię próbek aflatoksyną B₁. Odzyski w zakresie stężeń 1 i 2 µg/kg wynosiły 35 i 46%, co należy uznać za zbyt niskie. Dla wyższych stężeń odzyski wynosiły 78 – 97%. Wartości współczynników zmienności dla próbek fortyfikowanych wynoszą od 2,6 do 9,3%, a dla próbki niefortyfikowanej 20%.

Tabela I. Sprawdzenie wzorcowania fluorymetru
Check of fluorimeter calibration

Ilość dodana AFB ₁ [ng]	Ilość oznaczona AFB ₁ [ng]				Stosunek ilości oznaczonej do ilości dodanej [%]
	1	2	3	średnia	
0,5	0	0	0	0	0,0
1	0,13	0,21	0,23	0,19	19,0
2	1,3	1,8	1,5	1,45	72,5
4	3,4	3,4	3,4	3,4	85,0
6	5,9	5,8	6,1	5,9	98,9
8	7,7	7,5	7,8	7,6	95,8
10	9,7	10	11	10,2	102,3
20	20	21	20	20,3	101,7

Wg. wymagań obowiązujących w Wielkiej Brytanii, dla stężeń sumy aflatoksyn wynoszących 4 i 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ odzyski powyżej 70% należy uznać za zadowalające [12]. Również współczynniki zmienności określające wewnątrzlaboratoryjną precyzję metody (wg. wymagań brytyjskich dla stężenia 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ > 40%, dla stężenia 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ > 30%) trzeba określić jako dobre.

Dokładność metody sprawdzono oznaczając zawartość aflatoksyn w materiale odniesienia, w którym ogólna zawartość aflatoksyn wynosiła 10,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ \pm 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Oznaczona zawartość 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mieści się w deklarowanym przedziale stężeń (8,6–11,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$).



Rycina 1. Wykres sprawdzenia wzorcowania fluorymetru
Plot of Check of fluorimeter calibration

Tabela II. Oznaczanie zawartości aflatoksyny B₁ w próbkach fortyfikowanych i certyfikowanego materiału odniesienia
 Determination of aflatoxin B₁ in fortified samples and certified reference material

Ilość dodana/zawartość [μg/kg]	Ilość oznaczona [μg/kg]					Średnia [μg/kg]	SD [μg/kg]	RSD [%]	Błąd bezwzględny [μg/kg]	Odzysk [%]
	1	2	3	4	5					
	0	0,23	0,13	0,19	0,17	0,18	0,18	0,036	20,0	–
1	0,52	0,59	0,47	0,57	0,5	0,53	0,049	9,3	–0,47	35
2	1,2	1,1	1	1,1	1,1	1,10	0,070	6,4	–0,9	46
4	3,3	3,3	3,2	3,2	3,4	3,28	0,083	2,6	–0,72	78
6	5,3	5,2	5,9	5,8	5,3	5,50	0,324	5,9	–0,1	89
10	9,9	9,5	11	10	9,4	9,96	0,634	6,4	–0,04	98
CRM 385*										
10	12	11	11	10	11	10	0,7	6,4	–0,04	–

* certyfikowany materiał odniesienia – CRM 385: Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ and total aflatoxin in peanut butter (high level)

SD – odchylenie standardowe

RSD – współczynnik zmienności (względne odchylenie standardowe)

Powyższe parametry wskazują, że opisana metoda może być stosowana do szybkich oznaczeń półilościowych w rutynowej kontroli żywności, przy wymaganej obecnie granicy 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, niemniej tą metodą wyniki dodatnie powinny być potwierdzone inną metodą analityczną, np. wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC). Połączenie techniki przygotowania próbek w analityce za pomocą chromatografii powinowactwa z HPLC staje się również coraz powszechniejsze, ze względu na bardzo dobre i szybkie wstępne oczyszczenie ekstraktów [10,11].

Należy zwrócić uwagę na krótki czas wykonania analizy (pojedyncze oznaczenie trwa 10 – 15 min.), małe ilości stosowanych odczynników, brak konieczności posługiwania się wzorcami aflatoksyn, jak również prostotę postępowania analitycznego.

Oznaczono zawartość aflatoksyn w 10 próbkach orzechów arachidowych i 1 próbce percepanu (masa cukiernicza z jąder nasion brzoskwini). W jednej próbce orzechów arachidowych surowych importowanych z Chin stwierdzono szczególnie duże stężenie aflatoksyn (39 $\mu\text{g}/\text{kg}$) – tabela III. W pozostałych próbkach nie wykryto obecności aflatoksyny. W 3 próbkach wykryto aflatoksyny w stężeniach poniżej 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Świadczy to o konieczności ciągłego nadzorowania importowanych środków spożywczych w zakresie zanieczyszczenia aflatoksynami.

WNIOSKI

1. Metoda AFLATEST może być stosowana do półilościowego oznaczania aflatoksyn w rutynowej kontroli orzechów arachidowych i produktów z nich otrzymanych.

Tabela III. Wyniki oznaczeń zawartości aflatoksyn w orzechach arachidowych i percepanie
Results of determination of aflatoxins contamination in peanuts and percepan

Nr	Próbka badana	Stężenie [$\mu\text{g}/\text{kg}$]			Średnia [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
		1	2	3	
1.	Orzechy arachidowe łuskane (import Chiny)	n.w	n.w		
2.	Orzechy arachidowe niełuskane (import Chiny)	2,3	2,4		2,4
3.	Orzechy arachidowe niełuskane (import Chiny)	n.w	n.w		
4.	Orzechy arachidowe blanszowane (import Chiny)	n.w	n.w		
5.	Orzechy arachidowe palone (import Chiny)	0,23	0,18		0,2
6.	Orzechy arachidowe surowe (import Chiny)	41	37	40*	39
7.	Orzechy arachidowe surowe i niełuskane (import Chiny)	n.w	n.w		
8.	Orzechy arachidowe surowe (import Chiny)	n.w	n.w		
9.	Orzechy arachidowe surowe (import Chiny)	n.w	n.w		
10.	Orzechy arachidowe solone	n.w	n.w		
11.	Percepan	2,2	2,1		2,1

* oznaczenie wykonane z połowy objętości ekstraktu

n.w – nie wykryto

Jednak uzyskane tą metodą wyniki dodatnie powinny być potwierdzone inną metodą analityczną, np. HPLC.

2. Zaletami ocenianej metody jest szybki i prosty tok postępowania analitycznego, małe zużycie rozpuszczalników organicznych natomiast w kontroli rutynowej nie jest niezbędne stosowanie wzorców aflatoksyn.

J. Postupolski, B. Jankowska, B. Urbanek-Karłowska

EVALUATION OF THE IMMUNOAFFINITY CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH FLUORIMETRY DETECTION METHOD FOR DETERMINATION OF AFLATOXINS IN PEANUTS

Summary

The aim of the study was determination of the basic analytical parameters of the AFLATEST method (accuracy, precision, recovery) and testing of its usefulness in concentrations down to $10\mu\text{kg}$. In the test the studied extracts are purified passing them through columns with monoclonal antibodies, followed by fluorimetric determination after reaction with bromine solution.

The capacity and the efficiency of the columns were tested and fluorimeter calibration was checked.

The reliability of the method was assessed fortifying a series of arachids samples with aflatoxin B₁ and determining then recovery and precision. The accuracy of the method was checked by determination of certified reference standard.

In the light of the obtained results the AFLATEST method was found to be applicable for semiquantitative determination of aflatoxins in arachids in the concentrations above $5\mu\text{kg}$.

PIŚMIENNICTWO

1. Aflatest. Aflatoxin Testing System. User's Guide, VICAM, 1993. – 2. *Czerwiecki L.*: Mikotoksyny w żywności – wykrywanie i oznaczanie. Rozprawa habilitacyjna. Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Warszawa, 1993. – 3. *van Egmond H. P.*: Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. Food Addit. Contam., 1989, 6,2, – 4. *van Egmond H. P.*: Mycotoxins: regulations, quality assurance and reference material. Food Addit. Contam., 1995, 3, 321. – 5. *Groopman J. D., Donahue K. F.*: Aflatoxin, a human carcinogen: determination in foods and biological samples by monoclonal antibody affinity chromatography. Assoc. Off. Anal. Chem., 1988, 71, 861. – 6. IARC, Some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Lyon, 1993, 56, 245. – 7. IARC. Laboratory Decontamination and destruction of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, in laboratory wastes. IARC Scientific Publications, Lyon, 37, 1980. – 8. ISO/CD 14501 Milk and milk powder – determination of aflatoxin M₁ content – clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by HPLC, 1995. – 9. PN-R-64757:1994 Pasze. Aflatoksyny. Dopuszczalne zawartości i oznaczenie. – 10. *Scott P. M.*: Mycotoxin methodology. Food Addit. Contam., 1995, 3, 395.

11. *Trucksess M. W. et al.*: Immunoaffinity column coupled with solution fluorometry or liquid chromatography postcolumn derivatization for determination of aflatoxins in corn, peanuts, and peanut butter: collaborative study. J. Assoc. Anal. Chem., 1991, 74,81. – 12. *Whitaker T B et al.*: Evaluation of sampling plans used in the United States, United Kingdom and The Netherlands to test raw shelled peanuts for aflatoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1995, 78, 1010.